

Spermaadhesiner i olika fraktioner av hingstsperma

Anna-Carin Sjöberg

Handledare: Ann-Marie Tunón

Biträdande handledare: Heriberto Rodríguez-Martínez

**Inst. för kliniska vetenskaper, avd. för komparativ reproduktion, obstetrik och
juverhälsa**

ABSTRACT

Breeding-induced endometritis in horses seems to be down-regulated by certain components in the seminal plasma of the stallion's ejaculate. These components are most likely some of the proteins in the seminal plasma, the so-called spermadhesins. This study aimed to recognize these proteins and determine their quantities in different fractions of the ejaculate. Fractionated ejaculates from four stallions were used to determine the presence and amount of proteins by way of size-excluding chromatography. All former known proteins, except two, were recognized in this study. There were no differences among fractions; neither within nor among stallions. Further studies need to be performed in order to study which specific protein or proteins seem to be the most important in down-regulating breeding-induced endometritis. These proteins should in that case be included in the insemination dose.

SAMMANFATTNING

Betäckningsinducerad endometrit hos sto verkar nedregleras av vissa komponenter i seminalplasman i hingstens ejakulat. Dessa komponenter är sannolikt något eller några av de proteiner som finns i seminalplasman i hingstens ejakulat, de så kallade spermaadhesinerna. I denna studie undersöktes vilka dessa proteiner var och i vilken mängd de fanns i olika fraktioner av ejakulatet. Fraktionerade ejakulat från fyra hingstar användes för att bestämma vilka proteiner som fanns och hur stor deras mängd var genom kromatografi som sorterade proteinerna enligt storlek. Alla tidigare kända proteiner i seminalplasma hos hingst utom två hittades. Det fanns ingen skillnad mellan fraktionerna; varken mellan eller inom hingstarna. Vidare studier krävs för att undersöka vilket eller vilka specifika protein som är det/de viktigaste för nedregleringen av betäckningsinducerad endometrit. Dessa protein bör i så fall ingå i inseminationsdosen.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<u>ABSTRACT</u>	<u>3</u>
<u>SAMMANFATTNING</u>	<u>3</u>
<u>INLEDNING</u>	<u>7</u>
<u>MATERIAL OCH METODER</u>	<u>9</u>
<u>SPERMASAMLING</u>	<u>9</u>
<u>DJUR</u>	<u>9</u>
<u>METODER</u>	<u>9</u>
<u>PROTEINANALYS</u>	<u>9</u>
<u>RESULTAT</u>	<u>10</u>
<u>DISKUSSION</u>	<u>13</u>
<u>TACK</u>	<u>14</u>
<u>LITTERATURFÖRTECKNING</u>	<u>15</u>

INLEDNING

Efter betäckning/insemination drabbas sto av en lindrig endometrit, det vill säga en ospecifik livmoderinflammation som i det akuta skedet bland annat karaktäriseras av ett inflöde av framför allt neutrofila granulocyter. Några synliga tecken behöver inte alls förekomma; i den mån de ändå finns rör det sig i allmänhet om en lindrig flytning. Vid försök där man 6 timmar efter en intrauterin behandling med utspädningsvätska, seminalplasma, färsk eller fryst tinad sperma sköljde livmodern hos försökshästarna och dels tittade på inflammatoriska celler dels gjorde en bakteriologisk odling från vätskan, har man kommit fram till att denna betäckningsinducerade endometrit snarare beror på spermier än på bakteriell kontamination (Kotilainen et al., 1994). Endometriten får därför anses vara en komponent av de så kallade uterina försvarsmekanismerna (Troedsson et al., 2001) vars syfte tros vara att förbereda livmodern för att ta emot embryot. Spermier anses initiera kemotaxis och därmed främst inflöde av neutrofila granulocyter genom aktivering av komplementkaskaden (Troedsson et al., 2001).

Endometriten i sig orsakar frisättning av prostaglandin $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), vilken utlöser myometriekontraktioner, något som också anses vara viktigt i livmoderns reningsprocess (Troedsson et al., 2001). Hos normala ston är denna lindriga inflammation i allmänhet över inom 36-48 h (Katila, 2001). Hos dessa ston har spermainducerad leukocytos ingen påverkan på dräktighetsprocenten, något som ytterligare pekar på att detta skulle vara en del av en fysiologisk process. Ston som inte klarar av att rena livmodern från inflammatoriska produkter har en lägre dräktighetsprocent på grund av att den ökade $PGF2\alpha$ koncentrationen resulterar i luteolys. Dessa ston löper också större risk att drabbas av kvarstående endometrit, med påföljande svårigheter att klara av att bibehålla en dräktighet, och benämns endometritbenägna.

Vid det ovan beskrivna försöket har även observerats att efter inseminering med fryst sperma kan en mer markerad och förlängd endometrit ses än vid inseminering med exempelvis färsk sperma (Kotilainen et al., 1994). Man vet också sedan tidigare att seminalplasma undertrycker kemotaxis och fagocytos av polymorfonukleära celler (PMN) samt komplementaktiviteten i blodet in vitro (Troedsson et al., 1998). I senare studier har man visat att närvaron av seminalplasma i en inseminationsdos förkortar längden av den inducerade endometriten hos sto (Troedsson et al., 2001). Detsamma har observerats hos gyltor (Rozeboom et al., 1999). Detta tyder på att seminalplasma har en modulatorisk roll vid spermainducerad endometrit. Denna kunskap kan visa sig vara betydelsefull för hanteringen av inseminationsdoserna, då dessa idag innehåller så lite seminalplasma som möjligt och istället späds med andra tillsatser.

Ejakulatet består dels av spermier och dels av seminalplasma (Stabenfeldt, 1993). Den senare kommer från de accessoriska könskörtlarna (sädesblåsor, ampuller, prostata och bulbourethrala körtlar). Seminalplasman innehåller ett stort antal ämnen som är viktiga för spermernas kapacitering och överlevnad i livmodern. Bland annat finns där olika sockerarter för spermernas energiförsörjning och antioxidanter vilka är av särskild vikt hos hingstar då dessa har stor ejakulatvolym, låg sperma-

koncentration och liten andel kolhydrater i seminalplasman vilket gör dessa särskilt känsliga för oxiderande agens. Där finns också lipider, elektrolyter, hormoner såsom exempelvis prostaglandiner och slutligen ett antal proteiner vilka påverkar spermernas mognad och rörelseförmåga.

Ejakulatet från till exempel hingst och galt kommer i olika fraktioner; först en spermiefri fraktion, därefter en spermierik fraktion och till sist en fraktion som innehåller få eller inga spermier (Stabenfeldt, 1993). Vid fraktionering av seminalplasma efter molekylvikt har det observerats att ett 50-100 kDa stort protein är det som undertrycker kemotaxis av PMN:s mest (Troedsson et al., 1999). Seminalplasma innehåller ett flertal proteiner, 90% av dem är relativt stora (15-30 kDa). Resterande 10 % består av ett antal små proteiner (5-10 kDa) varav Akrosin inhibitor faktor (AIF) är den mest framträdande (Rodriguez-Martinez et al., under tryckning 2005). Vid försök att finna och identifiera de stora proteinerna, de så kallade sperma-adhesinerna, som finns i seminalplasma från hingst har åtta stycken hittats, samtliga med kapacitet att binda heparin, under benämning Horse Seminal Plasma (HSP) proteiner (Calvete et al., 1994).

HSP-1 och -2 tillhör en familj av heparinbindande proteiner och utgör den största delen av seminalplasman hos hingst. Tillsammans svarar de för 70-80 % av det totala proteininnehållet. De är strukturellt homologa och verkar inte visa någon likhet med något känt protein strukturellt. Därför tror man att HSP-1 och HSP-2 kan representera en hittills okänd proteinfamilj. HSP-3 uppvisar höggradiga likheter med ett glykoprotein som bekläder spermerna hos råtta. Liknande testikelspecifika genprodukter har även identifierats hos mus och människa. Proteinet verkar hos råtta spela en roll i processen där spermien och ägget fusionerar. HSP-4 liknar strukturellt calcitonin och katalcalcin (ett hormon som sänker kalciumnivån). Ytterligare forskning behövs för att kunna säga mer om dess roll. HSP-5 är ett heparinbindande protein som inte utforskats tillräckligt ännu. HSP-6 och 8 verkar vara isoformer av samma protein, varför man kan slå ihop dem till ett. Detta heterogena protein är strukturellt likt kallikrein, ett protein som man tidigare funnit i mänsklig prostata, Prostata specifik antigen (PSA). Dess funktion i seminalplasma hos hingst behöver undersökas noggrannare. HSP-7 är ett protein som ser ut som AWN-1, ett sperma-adhesin hos galt. HSP-7 verkar också ha samma funktion som AWN-1, vilket är att vara primärt spermieassocierade zona pellucida-bindande molekyler.

Denna studie ville ta reda på om det fanns olika sorters proteiner och/eller olika mycket av dem i olika fraktioner av seminalplasma hos hingst.

MATERIAL OCH METODER

Spermasamling

Djur

Sperman har donerats av Agricultural Research Centre, Yppäjä, Finland, där samlingen skedde under januari och februari månad 2003. Fyra olika hingstar (I – IV) användes och deras olika egenskaper beträffande ras, ålder och olika fertilitetsmått framgår av tabell 1.

Tabell 1. Olika egenskaper hos de fyra hingstarna i försöket. Medelvärde i populationen för ejakulatvolym är 70 (30-250) ml och för koncentrationen 120 (20-600) milj/ml. Normal total motilitet är över 50%, oftast över 70%.

	Ras	Ålder	Medelejakulatvolym	Medelkonc	Medeltotalantal	Motilitet, tot/prog
I	Finsk häst	16	51,0 ml	563 milj/ml	28.713 milj	60/50
II	Vbl trav	12	20,9 ml	773 milj/ml	16.156 milj	60/50
III	Finsk häst	24	93,3 ml	198 milj/ml	18.473 milj	50/30
IV	Finsk häst	17	45,5 ml	302 milj/ml	13.741 milj	40/30

Metoder

De fyra hingstarna tappades med hjälp av Equidame®, vilket är en automatiserad fantom där man kan få fraktionerade ejakulat (Lindeberg et al., 1999). Fantomen är höj- och sänkbar och har en artificiell vagina där värme och tryck kan regleras efter hingstens preferenser. Samlandet sker i 1-5 koppar, vilkas fyllnadsgrad regleras enligt förinställda mått. I kopp 1 finns största delen av förfraktionen, i kopp 2 den spermierika vilken även till viss del kan finnas i kopp 3. Kopp 4 innehåller i allmänhet enbart efterfraktionen. Kopp 5 används om ejakulatet har så stor volym att det behövs. Efter tappandet av hingsten mättes volym och koncentration i varje kopp. Fraktion 2 delades i två delar eftersom en av dessa skulle ingå i ett annat försök. Därefter centrifugerades varje fraktion för sig i 3,000 x g i 15 min varefter den filtrerades två gånger. Första gången genom ett 5 µm filter och andra gången genom ett 0,45 µm filter. Supernatanten (seminalplasman) frystes i kryotuber i -70 ° C.

I denna specifika studie analyserades fyra rekonstruerade fraktioner där fraktion 1 är förfraktionen, fraktion 2 den spermierika delen och fraktion 3 efterfraktionen. Fraktion 4 är en poolning av seminalplasma från de tre övriga fraktionerna och således i viss mån en efterlikning av hela ejakulatet.

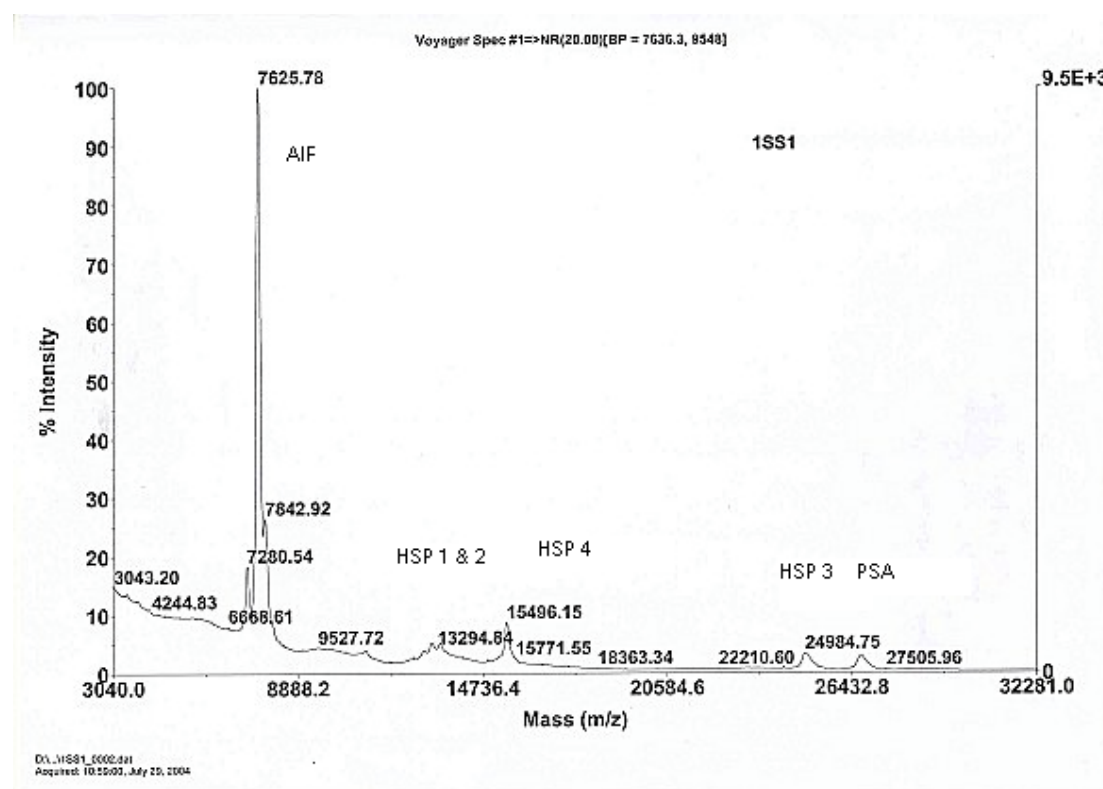
Proteinanalys

Seminalplasman analyserades vid Biomedicinska institutet, CSIC, Valencia, Spanien. Man gjorde en kromatografi som sorterade enligt proteinstorlek på en heparin-

Sepharose kolumn, ekvibrerad i Tris-HCl, NaCl, EDTA och 0,025 % sodium azide med ett slutligt pH på 7,4. Proteinidentitet och renhet kontrollerades med N-terminalsekvensering och massspektrometri enligt MALDI-TOF. Proteinkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt genom aminosyraanalys (Calvete et al., 1994, Carvalho et al., 2001, Reinert et al., 1996, Magdaleno et al., 1997 och Rodríguez-Martínez et al., under tryck 2004).

RESULTAT

Man kunde vid analysen identifiera sex olika proteiner hos samtliga fyra hingstar (se tabell 2 och figur 1). Dessa proteiner har alla tidigare blivit identifierade. Däremot återfanns ej de tidigare funna proteinerna HSP-5 och HSP-7 (motsvarande AWN hos svin) hos någon av hingstarna.



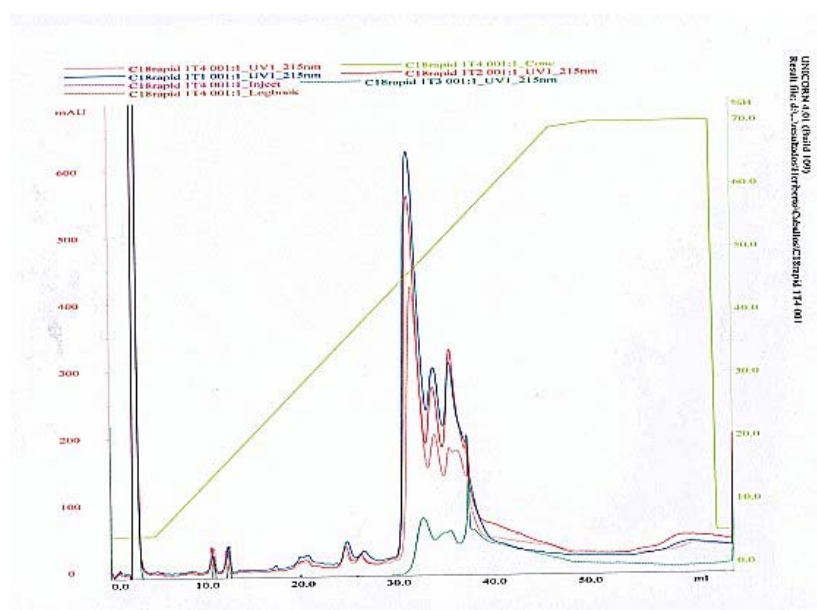
Figur 1. Proteinkurva över första ejakulatet första fraktionen hingst II. Varje pik representerar ett protein, detta namngivet bredvid/ovanför piken.

Tabell 2. Identifierade proteiner och deras kända egenskaper (Calvete et al., 1994, Rodriguez-Martinez et al., under tryckning 2004)

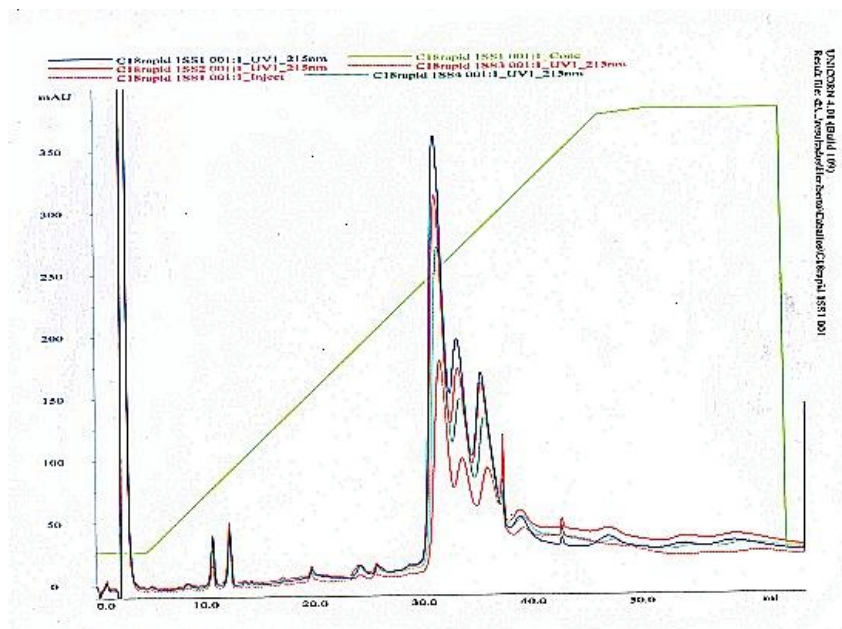
Protein	Molekylvikt	N-terminal sekvens	Proteinets roll
AIF	7,6 kDa	Okänd	Akrosomstabiliserande
HSP 1	12,5 kDa	DLQTXGADHSAXVNP	Heparinbindande
HSP 2	13,4 kDa	DQQPIAXDHXP	Heparinbindande
HSP 3	25,0 kDa	Blockerad slutsekvens	Medverkar i fusionsprocessen
HSP 4	15,5 kDa	ASLGDMLES LPDPXIA	Ej färdigställd
PSA	26,7 kDa	IIGGWEXEKHSPWQVAVY	Ej färdigställd

Det fanns kvantitativt mest proteiner i den spermierika fraktionen och minst i efterfraktionen. Ingen skillnad i proteinförekomst kunde för övrigt ses mellan protein-kurvorna, vare sig mellan de olika fraktionerna hos samma individ eller mellan de olika hingstarna. Figur 2-5 visar varje hingst separat med alla fyra fraktionerna markerade. Pikarna (vilka motsvarar de specifika proteinerna) ligger på samma ställe hos alla fyra hingstarna, det finns endast en viss skillnad i proteinmängd såväl mellan fraktionerna som mellan hingstarna.

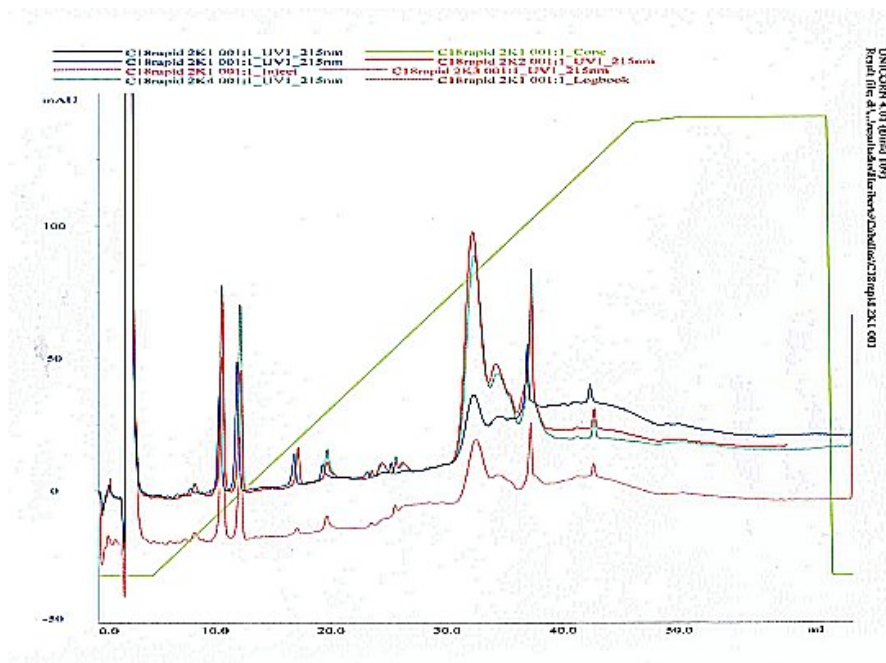
Figur2. Hingst 1: alla fyra fraktionerna. Pikarna ligger mitt för varandra och indikerar att det inte finns någon skillnad i proteininnehåll mellan de fyra fraktionerna. Det enda som skiljer är mängden av protein.



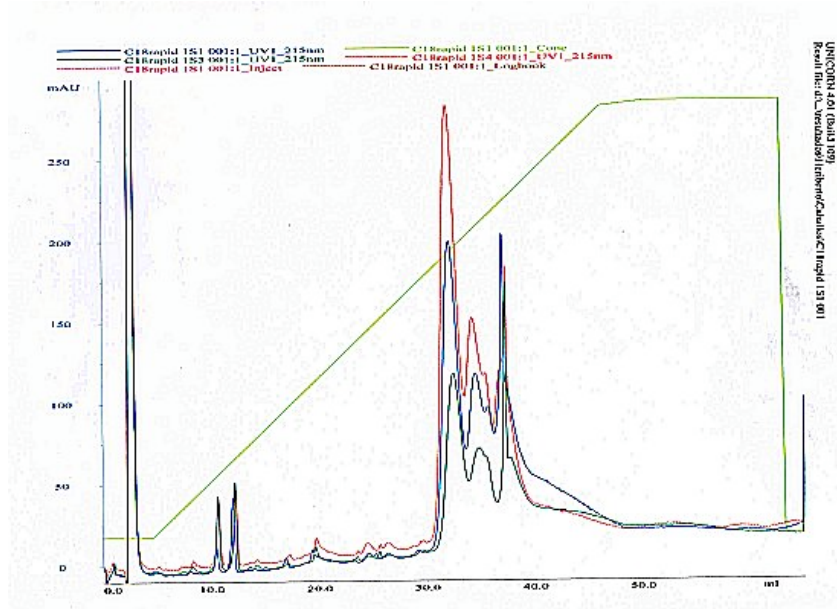
Figur 3. Hingst II: all fyra fraktionerna. Förklaring se figur 2.



Figur 4. Hingst III: alla fyra fraktionerna. Förklaring se figur 2.



Figur 5. Hingst IV: alla fyra fraktionerna. Förklaring se figur 2.



DISKUSSION

I vårt försök återfanns alla tidigare funna proteiner i seminalplasma utom HSP-5 och HSP-7. Calvete (1994) har endast nämnt att HSP-5 existerar, men HSP-7 har man funnit vid upprepade tillfällen och lagt en viss vikt vid eftersom det strukturellt liknar proteinet AWN-1 hos galt. Det finns några tänkbara förklaringar till varför detta protein inte har gått att identifiera hos någon av de fyra hingstarna:

- Det kan finnas individuella skillnader mellan olika hingstar. Detta känns ändå som en lite långsökt förklaring eftersom proteinet ju inte har återfunnits hos någon av de fyra försökshingstarna.
- Proteinet blir svår-detekterat i och med fraktioneringen. Om detta skulle vara fallet är det ändå lite underligt att proteinet inte hittas i åtminstone den fjärde fraktionen. Dock är denna en pooling och inte en sann fraktion.
- Analysförmågan har sannolikt utvecklats under de 10 år som gått sedan man först upptäckte proteinet, vilket skulle kunna spela en ganska viktig roll. Nutidens mycket finkänsliga instrument känner skillnad på olika delar i ett aggregat till exempel, vilket tidigare har kunnat uppfattas som ett enda protein.

- iv. Alla de fyra hingstarna är tappade på senvintern, utanför ordinarie betäckningssäsong. Inga uppgifter finns i tidigare försök om när på året spermasamlingen utförts, men detta är någonting som skulle kunna kontrolleras.

Det skulle kunna vara av intresse att undersöka detta närmare, taget de fyra ovanstående punkterna i beaktande.

Det verkar enligt Troedsson (1998) som om seminalplasman spelar rollen av inflammationsmodulator i den reningsprocess som livmodern genomgår. In vitro studier pekar mot att seminalplasma undertrycker opzoniseringen av spermierna, vilket gör att dessa skyddas från livmoderns fientliga miljö. Man har också sett att en 50-100 kDa stor fraktion i seminalplasman har störst nedreglerande effekt på kemo-taxis av PMN:s. Något så stort protein har inte hittats i detta försök, varför man kanske bör omvärdera uppgiften om storleken på proteinet. En intressant tanke skulle kunna vara om de två heparinbindande proteinerna HSP-1 och HSP-2 (vilka hittills inte haft någon känd uppgift i processen) hade med nedregleringen av inflammationen att göra. Dessa är båda ungefär 15 kDa stora, men är två stycken och svarar tillsammans för 70-80 % av det totala proteininnehållet. En analog till galt skulle kunna dras, då man sett att galtens heparinbindande seminalplasmaproteiner (PSP-I/PSP-II) verkar vara positiva för spermiernas överlevnadsförmåga (Rodríguez-Martínez et al., under tryckning 2005). Detta skulle kunna vara värt att undersöka vidare.

De små skillnader som i försöket fanns mellan de olika fraktionerna handlade framför allt om mängden protein. Man måste dock ifrågasätta om försöket genomfördes under optimala betingelser; tre fraktioner är möjligen i minsta laget, fem eller ännu hellre sju fraktioner hade möjligen varit lämpligare för att fånga upp små svängningar. Detta var dock inte genomförbart av praktiska skäl. Det är också möjligt att samlingsmetoden i detta fall inte blev den mest exakta, eftersom det insamlade materialet i första hand var tänkt till ett annat försök.

Vidare studier krävs för att bestämma vilket protein som dämpar den betäckningsinducerade endometriten och om det möjligen går att extrahera fram detta protein för tillsatts i semineringsdosen.

TACK

Detta arbete har kunnat utföras med hjälp av: personal på Yppäjä forskningscenter, Finland (särskilt Tiina Reilas), vilka har bidragit med samlandet av sperma/seminalplasma, personal på universitetet i Saari, Finland (särskilt professor Terttu Katila) vilka har hjälpt till med förvaringen och transporten av seminalplasma och biomedicinska institutet i Valencia, Spanien (särskilt professor J.J. Calvete) vilka har varit behjälpliga med proteinanalysen. Dessutom vill jag varmt tacka min handledare Ann-Marie Tunón och min biträdande handledare professor Heriberto Rodríguez-Martínez utan vilkas hjälp detta arbete inte kunnat utföras.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Calvete, J.J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E. & Töpfer-Petersen, E. (1994) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 411-426.
- Carvalho, A.L., Dias, J.M., Sanz, L., Romero, A., Calvete, J.J. & Romão, M.J. (2001) Purification, crystallization and identification by X-ray analysis of a prostate kallikrein from horse seminal plasma. *Acta. Cryst.* D57, 1180-1183.
- Katila, T. "Sperm-uterine interactions: a review". *Anim. Reprod. Sci.* Vol 68, Issues 3-4 2001. <http://www.sciencedirekt.com/science>
- Kotilainen, T., Huhtinen, M. & Katila, T. (1994) Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 41, 629-636.
- Lindeberg, H., Karjalainen, H., Koskinen, E. & Katila, T. (1999) Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame) versus a Missouri artificial vagina. *Theriogenology* 51, 1157-1173.
- Magdaleno, L., Gasset, M., Varea, J., Schambony, A.M., Urbanke, C., Raida, M., Töpfer-Petersen, E. & Calvete J.J. (1997) Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett.* 420, 179-185.
- Reinert, M., Calvete, J.J., Sanz, L., Mann, K. & Töpfer-Petersen, E. (1996) Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur. J. Biochem.* 242, 636-640.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L. & Calvete, J.J. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. Under tryckning 2005.
- Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H.T., Molitor, T.W. & Crabo, B.G. (1999) The Effect of Spermatozoa and Seminal Plasma on Leukocyte Migration into the Uterus of Gilts. *J. Anim. Sci.* 77, 2201-2206.
- Stabenfeldt, G.H. & Edqvist, L.E. (1993) Male reproductive processes. I: Dukes, H.H. (Red.) *Dukes physiology of domestic animals*. 11:te upplagan. 665-677. Ithaca: Cornell University Press.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M. & Crabo, B.G. (1998) Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology* 50, 807-818.
- Troedsson, M.H.T., Loset, K., Alghamdi, A.M., Dahms, B. & Crabo, B.G. "Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen". *Anim. Reprod. Sci.* Vol 68, Issues 3-4 2001. <http://www.sciencedirekt.com/science>
- Troedsson, M.H.T. (1999) Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52, 461-471.